



①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

⑫ **Gebrauchsmusterschrift**
⑩ **DE 200 10 297 U 1**

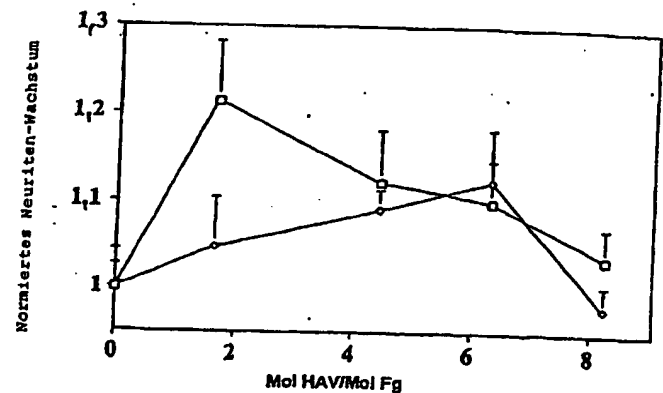
⑤1 Int. Cl.⁷:
C 07 K 14/745
A 61 K 38/17

②1 Aktenzeichen:	200 10 297.4
②2 Anmeldetag:	8. 6. 2000
④7 Eintragungstag:	31. 8. 2000
④3 Bekanntmachung im Patentblatt:	5. 10. 2000

DE 200 10 297 U 1

- ⑦3 Inhaber:
ETH Zürich, Zürich, CH; Universität Zürich, Zürich,
CH
- ⑦4 Vertreter:
Klunker, Schmitt-Nilson, Hirsch, 80797 München

- ⑤4 Enzymvermittelte Modifizierung von Fibrin zur Gewebemanipulation: Fibrin-Formulierungen mit Peptiden
- ⑤1 Fibrin-Gel, aufweisend ein die Neuriten-Extension förderndes Verhältnis eines Gemisches von Peptiden, wobei die Peptide mit dem Fibrin-Gel vernetzt sind.



Legende:
□ 24 Stunden
◇ 48 Stunden

DE 200 10 297 U 1

BEST AVAILABLE COPY

K 51 374/8

Enzymvermittelte Modifizierung von Fibrin zur Gewebemanipulation: Fibrin-Formulierungen mit Peptiden

10 Die vorliegende Erfindung betrifft allgemein das Gebiet von Materialien, die brauchbar sind bei der Unterstützung von Gewebe und bei Zell-Inkorporierung und -wachstum. Genauer betrifft sie bestimmte Substrate aus Protein, wie Fibrin, an die bioaktive Peptide und Peptid-Kombinationen gebunden sind.

15 Die aktive Domäne vieler Proteine kann in manchen Fällen zumindest teilweise durch die Verwendung kurzer Peptidsequenzen, die von der aktiven Stelle des Proteins stammen, nachgeahmt werden (Massia and Hubbell, 1991, Yamada, 1991). Durch dieses Verfahren kann die

20 Aktivität eines speziellen Proteins auf eine ansonsten nicht aktive Oberfläche oder Matrix übertragen werden. Dieses Verfahren erlaubt, daß eine viel höhere Konzentration aktiver Sequenzen auf einer Oberfläche immobilisiert wird, als natürlicherweise gefunden wird. Während für viele Peptide gezeigt wurde, daß sie eine monotone

25 Korrelation zwischen Dichte und Zellaktivität besitzen, sind andere Peptide dafür bekannt, eine maximale Aktivität bei einem gemäßigten Peptiddichte-Niveau zu erreichen. Das beste Beispiel ist die Wanderung von Zellen auf einer mit RGD (SEQ ID NO 2) beschichteten Oberfläche. Wenn die Konzentration an RGD (SEQ ID NO 2) zu hoch ist, bindet die

30 Oberfläche zu stark an die Zellen, was die Zellmigration hemmt. Wenn jedoch die RGD (SEQ ID NO 2)-Dichte zu gering ist, gibt es nicht

genug Zug, daß diese Zellen effektiv über die Oberfläche wandern, was zu einer maximalen Migrationsrate bei einer mäßigen Oberflächenkonzentration an Peptid führt (DiMilla, et al., 1991). Leider gibt es nicht sehr viel Forschung zur konzentrationsabhängigen Wirkung dieser Peptide in einer dreidimensionalen Matrix. Es ist nicht möglich, vorherzusagen, welche Peptide ein Sättigungsverhalten zeigen, und es ist nicht möglich, vorherzusagen, bei welcher Peptidkonzentration maximaler Nutzen beobachtet werden wird.

Während einzelne Peptide die Wirkung des gesamten Proteins teilweise nachahmen können, ist die Größe dieses Effekts typischerweise geringer. Das liegt an mehreren Gründen, einschließlich möglicher Veränderungen der Konformation, Peptid-Zugänglichkeit und Veränderungen der Löslichkeit zwischen dem Peptid und dem Protein. Ein zusätzlicher Unterschied ist, daß die Wechselwirkung zwischen Zellen und einzelnen Proteinen oder einer gesamten extrazellulären Matrix das gleichzeitige Binden an vielfache Peptidsequenzen beinhaltet (Martin, 1987, Kleinman, et al., 1993). Manchmal sind diese Sequenzen auf demselben Protein, aber oft sind sie auf verschiedenen Proteinen. Im allgemeinen ist es nicht möglich, vorherzusagen, welche Kombinationen negativ wechselwirken könnten, welche additiv wechselwirken könnten, und welche synergistisch wechselwirken könnten.

Berichte in der Literatur betreffen Entdeckungen, das Heparin bindende Domänen von Proteinen sowie Rezeptor-Vermittelt bindende Domänen die Neuronen-Anhaftung und Neurit-Verlängerung fördern. Es wurden viele Heparin bindende Domänen identifiziert (Tabelle 1), und außerdem wurde von Heparin bindenden Bereichen mehrerer Proteine wie dem Nervenzellen-Adhäsionsmolekül, Fibronectin, Laminin, Midkine und

Antithrombin III berichtet, daß sie die Neuriten-Extension auf zweidimensionalen Oberflächen fördern. (Edgar et al., 1984, Borrajo et al., 1997, Kallapur and Akeson, 1992, Kaneda et al., 1996, Rogers et al., 1985). Von diesen Heparin-bindenden Domänen wurde durch
5 indirekten Beweis gezeigt, daß sie mit Zelloberflächen-Proteoglykanen wechselwirken, mittels einer Anzahl von Verfahren, einschließlich Hemmung durch lösliches Heparin, enzymatische Entfernung der Zelloberflächen-Proteoglykane und biochemischer Hemmung der Proteoglykan-Synthese (Kallapur and Akeson, 1992). Diese Peptide
10 wurden nur in zweidimensionalen Systemen untersucht.

Die vorliegende Erfindung offenbart eine Vielfalt biologisch besonders aktiver Zellmatrices, an die eine Anzahl von Zelltypen gebunden werden und wachsen kann. Beispielsweise stellt die Erfindung Protein-Matrices
15 bereit, die modifiziert wurden, um chemisch quervernetzte Peptide zu enthalten. Diese Peptide können so definiert werden, daß sie eine Sequenz haben, die Heparin-bindende Bereiche mehrere Proteine, wie dem Nervenzellen-Adhäsionsmolekül, Fibronectin, Laminin, Midkine und Antithrombin III nachahmt. Diese Peptide werden chemisch mit
20 Protein- und/oder Fibrin-Gelen, den Protein-Matrices, quervernetzt, um besonders wirkungsvolle Plattformen für die Bindung und Extension einer Vielfalt unterschiedlicher Zelltypen zu liefern. Die Protein-Matrix enthält bevorzugt mindestens ein Peptid in einer Neuriten-Wachstum und -Extension fördernden Menge.

25 Die Protein-Matrices der vorliegenden Erfindung können ein einzelnes oder mehrere Peptide enthalten, die chemisch damit vernetzt sind. Ein solches Peptid ist beispielsweise HAV (SEQ ID NO 6). Beispielsweise kann das HAV (SEQ ID NO 6)-Peptid in die Fibrin-Gele der

vorliegenden Erfindung mit einer Konzentration von etwa 2 Mol Peptid/Mol Fibrin-Gel hineinvernetzt werden. Ein weiteres Peptid, das mit den Matrices der vorliegenden Erfindung verwendet werden kann, ist RGD (SEQ ID NO 2). Dieses Peptid kann beispielsweise in vernetzter Weise mit einer Konzentration von etwa 1,5 Mol RGD-Peptid/Mol Fibrin-Gel an die Matrix gebunden werden. Noch ein weiteres Peptid, das an die Matrices der Erfindung gebunden werden kann, ist IKVAV (SEQ ID NO 1). Eine beispielhafte Konzentration dieses Peptids, die von den Erfindern vorliegender Erfindung für wirksam befunden wurde, war eine Konzentration von etwa 8 Mol Peptid/Mol Fibrin-Gel. Andere Beispiele für Peptide, die bei der Durchführung der vorliegenden Erfindung verwendet werden können, sind das Peptid YIGSR (SEQ ID NO 3) und das Peptid RNIAEIIKDI (SEQ ID NO 5). Für diese speziellen Peptide wurde gefunden, daß sie für die Durchführung der vorliegenden Erfindung besonders wirksam sind, wenn sie in einer Konzentration von etwa 6 Mol YIGSR (SEQ ID NO 3)-Peptid/Mol Fibrin-Gel und in einer Konzentration von etwa 8 Mol RNIAEIIKDI (SEQ ID NO 5)-Peptid/Mol Fibrin-Gel verwendet werden.

In anderer Hinsicht betrifft die vorliegende Erfindung eine Protein-Matrix, die ein Gemisch aus mindestens zwei Peptiden enthält. Beispielsweise können diese Peptide darüberhinaus angegeben werden als Peptid HAV (SEQ ID NO 6), IKVAV (SEQ ID NO 1), RNIAEIIKDI (SEQ ID NO 5), YIGSR (SEQ ID NO 3), DGEA (SEQ ID NO 4), eine Kombination davon, eine Kombination von Peptid-Fragmenten, aufweisend HAV (SEQ ID NO 6), IKVAV (SEQ ID NO 1), RNIAEIIKDI (SEQ ID NO 5), YIGSR (SEQ ID NO 3) und DGEA (SEQ ID NO 4), oder ein Fusionspeptid, das diese Peptide enthält. Beispielsweise kann eine Ausführungsform der Erfindung eine Fibringel-

Matrix aufweisen, die ein damit vernetztes Gemisch von Peptiden enthält, wobei dieses bestimmte Gemisch von Peptiden so definiert ist, daß es IKVAV (SEQ ID NO 1), RGD (SEQ ID NO 2), YIGSR (SEQ ID NO 3) und RNIAEIIKDI (SEQ ID NO 5) enthält, wobei die bestimmte Fibringel-Matrix im wesentlichen frei von HAV (SEQ ID NO 6)-Peptid ist. Der Begriff "im wesentlichen frei", wie er in der Beschreibung der vorliegenden Erfindung verwendet wird, ist definiert als im wesentlichen Fehlen irgendeiner Konzentration des HAV (SEQ ID NO 6)-Peptids, die eine neuritenextensionshemmende Wirkung auf Neuritzellen, die mit einem Fibrin-Gel vernetzt sind, haben würde.

In einigen Ausführungsformen kann die Erfindung definiert werden als ein Protein-Gel, das eine neuritenextensionsfördernde Menge eines bestimmten Verhältnisses des Peptids HAV (SEQ ID NO 6) und des Peptids YIGSR (SEQ ID NO 3) aufweist. Ein Verhältnis von etwa 1 HAV (SEQ ID NO 6):3 YIGSR (SEQ ID NO 3), in eine Proteingel-Matrix hineinvernetzt, wurde von den Erfindern der vorliegenden Erfindung als bei der Durchführung der vorliegenden Erfindung besonders brauchbar gefunden. In noch einer anderen Hinsicht kann das Protein-Gel eine die Neuritenextension fördernde Menge eines Verhältnisses des Peptids HAV (SEQ ID NO 6) und des Peptids RNIAEIIKDI (SEQ ID NO 5) enthalten. Wenn dies die zwei Peptide der Wahl sind, können sie in einem Verhältnis von etwa 1:3, vernetzt mit dem Protein-Gel, enthalten sein. In noch anderen Ausführungsformen der Erfindung kann das Protein-Gel ein erstes Peptid RGD (SEQ ID NO 2) und ein zweites Peptid YIGSR (SEQ ID NO 3) enthalten. Alternativ kann das Protein-Gel einen Anteil des Peptids RGD (SEQ ID NO 2) zusammen mit dem Peptid DGEA (SEQ ID NO 4) enthalten. Das

Verhältnis dieser zwei Peptide relativ zueinander, das bei der vorliegenden Erfindung verwendet werden kann, ist etwa 1:3.

5 In noch einer weiteren Hinsicht kann die Protein-Gel-Matrix der vorliegenden Erfindung ein Gemisch aus drei oder mehr Peptiden enthalten. Beispielsweise kann ein Gemisch aus Peptid RGD (SEQ ID NO 2), Peptid YIGSR (SEQ ID NO 3) und Peptid RNIAEIIKDI (SEQ ID NO 5) in dem Protein-Gel enthalten sein, bevorzugt in vernetzter Weise, wobei diese drei Peptide in einem Verhältnis von jeweils etwa 10 1:1:1 enthalten sein sollten.

Alle der obigen Protein- und Gel-Matrices können außerdem als dreidimensionale Matrices definiert werden. Überraschenderweise wurde von diesen dreidimensionalen, zur Aufnahme der hierin beschriebenen 15 Peptide modifizierten Matrices gefunden, daß sie vorteilhafterweise eine Steigerung, und in einigen Fällen eine synergistische Steigerung, des Neuritzellen-Wachstums und der Neuritzellen-Extension liefern.

20 In einigen Ausführungsformen stellt die Erfindung Fibrin-Gel-Matrices bereit. Diese speziellen Ausführungsformen weisen wiederum ein die Neuritenextension förderndes Verhältnis eines Gemisches von Peptiden auf. Diese Peptide sind wiederum an das Fibringel vernetzt gebunden. Die speziellen Matrices der vorliegenden Erfindung können auch ein anderes Protein-Gel als Fibrin enthalten. Einige Ausführungsformen des 25 Protein-Gels enthalten, vernetzt daran gebunden, ein Gemisch von Peptiden, wie sie vorstehend beschrieben sind, in die Neuritenextension fördernden Verhältnissen.

In einer weiteren Hinsicht stellt die Erfindung noch ein Zwei-Domänen-Peptid bereit. Das Zwei-Domänen-Peptid kann in einigen Ausführungsformen so definiert werden, daß es eine erste Domäne aus einer Heparin-bindenden Domäne und eine zweite Domäne, die im wesentlichen aus einem Faktor XIIIa-Substrat oder einem bioaktiven Peptid besteht, aufweist. Das Zwei-Domänen-Peptid kann in einigen speziellen Ausführungsformen außerdem so definiert werden, daß es eine erste Domäne aus einem Peptid K(β A)FAKLAARLYRKA (SEQ ID NO 8) oder YKKIIKKL (SEQ ID NO 9) oder KHKGRDVILKKDVR (SEQ ID NO 10) oder einem Gemisch aus mehreren davon aufweist. Proteingele, welche die vorstehend beschriebenen Zwei-Domänen-Peptide chemisch damit vernetzt enthalten, können so gemäß der vorliegenden Erfindung ebenfalls bereitgestellt werden.

Noch ein weiterer Aspekt der Erfindung stellt Fibrin bereit, das zur Aufnahme der Zwei-Domänen-Peptide, wie sie hierin beschrieben wurden, modifiziert wurde. Beispielsweise kann das zur Modifizierung von Fibrin verwendete Zwei-Domänen-Peptid außerdem so beschrieben werden, daß es eine Heparin-bindende Domäne aus ATIII (SEQ ID NO 18) aufweist. Das spezielle Peptid mit Heparin-bindender Domäne, das gemäß der vorliegenden Erfindung zur Modifizierung einer Fibrin-Matrix oder einer Zell-Matrix, die zumindest teilweise Fibrin enthält, verwendet werden kann, kann definiert werden als ein Peptid mit Heparin-bindender Domäne, das aus einer Heparin-Affinitätssäule bei [NaCl] > 0,34 Mol eluiert.

Die hierin beschriebenen, verschiedenen Peptid-modifizierten Fibrin-Matrices können außerdem als ein Protein-Gel, das vernetzte Peptide enthält, definiert werden. Ein Protein-Gel, das einen chemisch

gebundenen Protease-Hemmer (Protease-Inhibitor) aufweist, liefert noch eine weitere Ausführungsform der vorliegenden Erfindung. Beispielsweise kann der Protease-Hemmer als α 2-PI definiert werden. Der Protease-Hemmer kann noch darüberhinaus als modifiziertes Aprotinin mit einer Faktor XIIIa-Substrat-Stelle definiert werden.

Der Protease-Hemmer kann außerdem so definiert werden, daß er ein modifiziertes Aprotinin, ein Faktor XIIIa-Substrat und eine Protease-Abbau-Stelle aufweist. Bei einigen Ausführungsformen kann der Protease-Hemmer außerdem so definiert werden, daß er ein modifiziertes Aprotinin und eine Heparin-Bindungsdomänen-Sequenz aufweist. In noch weiteren Ausführungsformen kann der Protease-Hemmer so definiert werden, daß er ein modifiziertes Aprotinin aufweist, das eine hbd (Heparin-bindende Domäne) und eine Protease-Abbau-Stelle hat. Das Protein-Gel der Erfindung kann darüberhinaus so definiert werden, daß es ein Peptid mit einer kovalent in das Gel inkorporierten Protease-Bindungsstelle aufweist. Die Protease-Bindungsstelle kann in einigen Ausführungsformen der Erfindung außerdem definiert werden als eine Stelle für enzymatische Spaltung, wobei diese enzymatische Spaltungs-Stelle eine niedere k_{cat} und eine hohe k_m hat. In noch anderen Ausführungsformen kann die Protease-Bindungsstelle außerdem als eine enzymatische Bindungs-Domäne definiert werden.

In noch einer weiteren Hinsicht liefert die vorliegende Erfindung dreidimensionale Matrices, die in der Lage sind, die Neuritenzellen-Extension zu unterstützen. In einigen Ausführungsformen kann die Matrix so definiert werden, daß sie eine die Neuritenzellen-Extension fördernde Menge eines Gemisches von Peptiden aufweist, wobei jedes der Peptide eine Sequenz aufweist, die eine Heparin-bindende Sequenz

definiert. Diese dreidimensionalen Matrices können außerdem als Fibrin-Gele oder Protein-Gele definiert werden. Wenn die dreidimensionalen Matrices ein Gemisch von Peptiden enthalten, können diese Peptide außerdem so definiert werden, daß sie eine Sequenz haben, die ein Heparin-bindendes Peptid von Antithrombin II aufweist. Das Heparin-bindende Peptid wird chemisch an die dreidimensionale Matrix gebunden und kann insbesondere als mit der Matrix vernetzt beschrieben werden. Bestimmte Ausführungsformen der dreidimensionalen Matrix der Erfindung können außerdem so definiert werden, daß sie ein Fibrin-Gel aufweisen. Wenn das in der dreidimensionalen Matrix enthaltene Peptid ein Heparin-bindendes Peptid ist, kann das Peptid außerdem als eine Sequenz von Antithrombin III definiert werden.

In noch einer weiteren Hinsicht liefert die Erfindung chimäre Peptide. In einigen Ausführungsformen enthält das chimäre Peptid eine erste C-terminale Domäne, die eine Heparin-bindende Peptidsequenz von Antithrombin III aufweist, und eine zweite N-terminale Domäne, die ein $\alpha 2$ -Plasmininhibitor-Substrat für Faktor XIIIa aufweist. Dreidimensionale Matrices aus Protein und/oder insbesondere Fibrin, an die die vorgenannten chimären Peptide chemisch vernetzt gebunden sind, werden ebenfalls durch die vorliegende Erfindung bereitgestellt. Beispielsweise kann ein Fibrin-Gel gemäß dieser Ausführungsform außerdem so definiert werden, daß es eine die Neuritenextension fördernde Menge von etwa 8 Mol des chimären Peptids/Mol Fibrin enthält.

Sequenz-ID-Tabelle

5	SEQ ID NO	SEQUENZ
	1	IKVAV
	2	RGD
	3	YIGSR
10	4	DGEA
	5	RNIAEIIKDI
	6	HAV
	7	NCAM
	8	K(β A)FAKLAARLYRKA
15	9	YKKIIKKL
	10	KHKGRDVILKKDVR
	11	YEKPGSPPREVVPRPRPCV
	12	KNNQKSEPLIGRKKT
	13	KDPKRL
20	14	YRSRKY
	15	YKKPKL
	16	AKRSSKM
	17	CRKRCN
	18	LNQEQVSP K(β A)FAKLAARLYRKA
25	19	LNQEQVSP YKKIIKKL
	20	LNQEQVSP KHKGRDVILKKDVR

30 Die folgenden Zeichnungen bilden einen Teil der vorliegenden Beschreibung und sind enthalten, um bestimmte Aspekte der vorliegenden Erfindung weiter zu erläutern. Die Erfindung kann durch Bezugnahme auf eine oder mehrere dieser Zeichnungen in Kombination mit der hierin gegebenen genauen Beschreibung spezieller

35 Ausführungsformen besser verstanden werden.

Figur 1: Steigerung des Neuriten-Auswuchses mit HAV (SEQ ID NO 6)-modifizierten Fibrin-Gelen. Eine Konzentrationsreihe von HAV

(SEQ ID NO 6), vernetzt in Fibrin, wurde dreifach mit 8-Tage-Küken-Spinalganglien getestet. Der Wachstumsstand bei 24 und 48 Stunden wurde berechnet und auf Wachstum in unmodifiziertem Fibrin normiert. Gezeigt sind der mittlere Fehler und der Standardfehler des Mittelwerts.

5

Figur 2: Steigerung des Neuriten-Auswuchses mit RGD (SEQ ID NO 2)-modifizierten Fibrin-Gelen. Eine Konzentrationsreihe von RGD (SEQ ID NO 2), vernetzt in Fibrin, wurde dreifach mit 8-Tage-Küken-Spinalganglien getestet. Weil Fibrin natürlicherweise zwei aktive RGD (SEQ ID NO 2)-Stellen enthält, wird die Inkorporierungs-Menge an RGD (SEQ ID NO 2) 2 bis 10 Mol RGD (SEQ ID NO 2)/Mol Fg anstelle von 0-8. Der Wachstumsstand bei 24 und 48 Stunden wurde berechnet und auf Wachstum in unmodifiziertem Fibrin normiert. Gezeigt sind der mittlere Fehler und der Standardfehler des Mittelwerts.

10

15

Figur 3: Steigerung des Neuriten-Auswuchses mit IKVAV (SEQ ID NO 1)-modifizierten Fibrin-Gelen. Eine Konzentrationsreihe von IKVAV (SEQ ID NO 1), vernetzt in Fibrin, wurde dreifach mit 8-Tage-Küken-Spinalganglien getestet. Der Wachstumsstand bei 24 und 48 Stunden wurde berechnet und auf Wachstum in unmodifiziertem Fibrin normiert. Gezeigt sind der mittlere Fehler und der Standardfehler des Mittelwerts.

20

Figur 4: Steigerung des Neuriten-Auswuchses mit RNIAEIIKDI (SEQ ID NO 5)-modifizierten Fibrin-Gelen. Eine Konzentrationsreihe von RNIAEIIKDI (SEQ ID NO 5), vernetzt in Fibrin, wurde dreifach mit 8-Tage-Küken-Spinalganglien getestet. Der Wachstumsstand bei 24 und 48 Stunden wurde berechnet und auf Wachstum in unmodifiziertem Fibrin normiert. Gezeigt sind der mittlere Fehler und der Standardfehler des Mittelwerts.

25

5

10

25

bezeichnet, steht für die vier wichtigen, von Laminin stammenden Peptide RGD (SEQ ID NO 2), IKVAV (SEQ ID NO 1), RNIAEIIKDI (SEQ ID NO 5) und YIGSR (SEQ ID NO 3), wobei diese Peptide in äquimolaren Mengen von 2 Mol Peptid/Mol Fg gepfropft wurden. Gezeigt sind der mittlere Fehler und der Standardfehler des Mittelwerts.

Figur 8: Von drei getrennten Proteinen stammende, Heparin-bindende Peptide, NCAM (SEQ ID NO 7), Plättchenfaktor 4 und Antithrombin III, wurden mit 8 Mol/Mol Fg in Fibrin vernetzt. Der Stand des Neuriten-Auswuchses bei 48 Stunden wurde gegen Wachstum in unmodifiziertem Fibrin normiert und ist unten gezeigt. Zusätzlich wurden Kontrollen von vernetztem Peptid mit Heparin oder nur lösliches Peptid getestet. Das Wachstum ist nachstehend gezeigt. Der Wachstumsstand ist beträchtlich verschieden von unmodifiziertem Fibrin ($p < 0,05$), das mit einem Stern bezeichnet ist. Gezeigt sind der mittlere Fehler und der Standardfehler des Mittelwerts.

Seit langem bestehender Übereinkunft im gewerblichen Rechtsschutz folgend bedeuten die Begriffe "ein", "eine" oder "einer", wenn sie in dieser Anmeldung, einschließlich der Ansprüche, verwendet werden, "ein/eine/einer oder mehrere".

Die folgenden Beispiele wurden aufgenommen, um bevorzugte Ausführungsformen der Erfindung zu zeigen. Von Fachleuten sollte anerkannt werden, daß die in den folgenden Beispielen offenbarten Techniken darstellen, von denen der Erfinder erkannte, daß sie bei der Ausführung der Erfindung gut funktionieren, und daher kann man davon ausgehen, daß sie bevorzugte Arten für ihre Ausführung darstellen. Jedoch sollten Fachleute, im Licht der vorliegenden

BEISPIEL 1

5 Im vorliegenden Beispiel wird die biologische Wirkung inkorporierter
Peptide in einer dreidimensionalen Matrix gezeigt. Mehrere
Peptidssequenzen von extrazellulären Matrixproteinen wurden ausgewählt.
Diese Proteine wurden teilweise ausgewählt, weil von ihnen die
Fähigkeit berichtet wurde, den Neuriten-Auswuchs zu steigern (Yamada,
1991, Tashiro et al., 1989). Diese Proteine wurden bei verschiedenen
10 Konzentrationen getestet. Zum Testen dieser Peptide wurden spezielle
ausgewählte Peptidsequenzen in eine dreidimensionale Fibrin-Matrix
quervernetzt, wobei 8-Tage-Spinalganglien in die Gele eingebettet
wurden. Die Neurite wurden 48 Stunden lang wachengelassen, und die
Migrationsgeschwindigkeit der Neuriten, die sich von den Ganglien
15 erstreckten, wurde für jede Bedingung sowohl bei 24 als auch bei 48
Stunden quantitativ bestimmt. Dieses Wachstum wurde dann auf das
Wachstum in unmodifiziertem Fibrin normiert. Es wurde gefunden, daß
die Fähigkeit einiger dieser Peptide, den Neuriten-Auswuchs zu steigern,
mit der Peptid-Konzentration ansteigt, während andere Peptide bei einer
20 mäßigen Peptid-Konzentration eine maximale Steigerung erreichen. Für
zwei Peptide, die getestet wurden, eines von N-Cadherin, nämlich das
Tripeptid HAV (SEQ ID NO 6) (Figur 1), und eines, das in vielen
extrazellulären Matrixproteinen vorkommt, nämlich RGD (SEQ ID NO
2) (Figur 2), wurde gezeigt, daß sie eine maximale Wirkung bei einer
25 mäßigen Konzentration von inkorporiertem Peptid erreichen. HAV (SEQ
ID NO 6) erzielte eine maximale Wirkung bei 2 Mol/Mol Fg, während
RGD (SEQ ID NO 2) eine maximale Wirkung bei 1,5 Mol/Mol Fg
inkorporiertem Peptid erzielte. Im Gegensatz dazu wurde für die
Peptidsequenzen IKVAV (SEQ ID NO 1) (Figur 3), RNIAEIIKDI (SEQ

5 ID NO 5) (Figur 4) und YIGSR (SEQ ID NO 3) (Figur 5) gezeigt, daß sie eine lineare Korrelation zwischen Peptid-Konzentration und dem Ausmaß der Steigerung besitzen. YIGSR (SEQ ID NO 3), IKVAV (SEQ ID NO 1) und RNIAEIIKDI (SEQ ID NO 5) zeigten eine maximale Steigerung bei 6, 8 bzw. 8 Mol Peptid/Mol Fibrinogen.

BEISPIEL 2 - Fibrin-Gele mit mehreren Peptiden

10 Weil für zwei der getesteten Peptide gefunden wurde, daß sie auf das verwendete Neuronenzellmodell eine maximale Wirkung bei niedrigen Konzentrationen haben, ist es möglich, diese Peptide in einer niedrigen Konzentration zu inkorporieren und doch eine große neuronale Wirkung zu beobachten, wobei viele Vernetzungsstellen offengelassen werden. Die
15 verbleibenden Stellen können dann mit einem anderen Peptid besetzt werden, das seine maximale Wirkung bei einer hohen Konzentration besitzt.

20 Die Erfinder der vorliegenden Erfindung gingen den obigen Weg, wobei sie mehrere Peptide verwendeten. In einem Beispiel wurde HAV (SEQ ID NO 6) zu 2 Mol/Mol Fibrinogen in Kombination mit den folgenden Peptiden zu 6 Mol/Mol Fibrinogen vernetzt: IKVAV (SEQ ID NO 1), RNIAEIIKDI (SEQ ID NO 5), YIGSR (SEQ ID NO 3) und DGEA (SEQ ID NO 4). Das Wachstum, das erhalten wurde, wenn die Peptide
25 gemeinsam gefropft wurden, wenn die Peptide alleine gefropft wurden, und die theoretische Summe, die aus den Ergebnissen der zwei getrennt gefropften Peptide erhalten wurde, ist in Fig. 6 gezeigt. Das Vernetzen von HAV (SEQ ID NO 6) mit IKVAV (SEQ ID NO 1) führt zu einer negativen Wechselwirkung, bei der die Wirkung auf den

höher war als die kombinierten Wirkungen der alleine gepfropften Peptide. Für diese Peptide wurde daher in den vorliegenden Studien gezeigt, daß sie synergistisch wirken, wenn sie gemeinschaftlich in Fibrin gepfropft werden (Figur 7).

5

10 Durch Verwendung einer Peptid-modifizierten Fibrin-Matrix wurde ein neues Verfahren entwickelt, das mehrere aktive Peptide in drei Dimensionen einsetzt. Es wird gezeigt, daß der Zusatz von Protease-Inhibitoren keine Auswirkung auf den zweidimensionalen Neuriten-Auswuchs hat, aber daß der Zusatz derselben Inhibitoren den Neuriten-Auswuchs dreidimensional verringert (Herbert et al., 1996). Daher wird es unmöglich, die Aktivität dieser Peptide in drei Dimensionen aus dem zweidimensionalen Modell vorherzusagen, weil der Effekt der Proteolyse für dreidimensionale Migration oft der begrenzende Faktor wird.

15

Zwei-Domänen-Peptide, die sowohl ein Faktor XIIIa-Substrat als auch eine Heparin-bindende Domäne enthielten (Tabelle 2), wurden synthetisiert und in Fibrin-Gele vernetzt, wie es vorher gezeigt wurde, mit einer Abwandlung.

20

Tabelle 2 zeigt die genauen Sequenzen von Zwei-Domänen-Peptiden, die die Faktor XIIIa-Substrat-Sequenz und die Sequenz der Heparin-bindenden Domäne enthalten. Der Ursprung für jede Heparin-bindende Domäne ist ebenfalls gezeigt.

25

Tabelle 2

	Peptid-Name	Sequenz	Ursprung
5	ATIII	<i>LNQEQVSP K(βA)FAKLAARLYRKA</i> (SEQ ID NO 18)	Antithrombin III
10	NCAM	<i>LNQEQVSP YKKIIKKL</i> (SEQ ID NO 19)	Nervenzellen- Adhäsionsmolekül
	PF4	<i>LNQEQVSP KHKGRDVILKKDVR</i> (SEQ ID NO 20)	Plättchenfaktor 4

(Kursivschrift bezeichnet ein Faktor XIIIa-Substrat)

20

In einem Beispiel wurde das Peptid alleine in das Gel vernetzt, und in dem zweiten Beispiel wurde es in Anwesenheit von Heparin inkorporiert. Diese zwei Verfahren führten zu Gelen, bei denen eine identische Konzentration an Zwei-Domänen-Peptid kovalent an das Fibrin gebunden war, aber das erste Beispiel führte dazu, daß freie Heparin-bindende Domänen im Gel vorhanden waren, während der Zusatz von Heparin unter den Beispielbedingungen dazu führte, daß diese Domäne mit einem Heparinfragment besetzt wurde. Daher konnten die Auswirkungen der Wechselwirkung zwischen den wachsenden Neuriten und entweder einer Heparin-bindenden Domäne oder Heparin selbst bestimmt werden. Wenn das Peptid ohne die Anwesenheit von Heparin inkorporiert wurde, war es in der Lage, die Extension von Neuriten von 8-Tage-Küken-Spinalganglien zu steigern. Es wurden drei Zwei-Domänen-Peptide, jedes mit einer anderen Heparin-bindenden Domäne, getestet und ergaben statistisch ein besseres Wachstum als unmodifiziertes Fibrin (Figur 8).

35

Das Ausmaß der Verbesserung lag im Bereich von 75% bis 25%. Dieses Steigerungs-Ausmaß konnte mit der Bindungsaffinität der Heparin-bindenden Domäne, die inkorporiert wurde, korreliert werden (Tabelle 3). Wenn zu Beginn der Untersuchung Heparin zugegeben wurde, wurde festgestellt, daß dies die Wirkung beseitigte, was zu einem ähnlichen Wachstum wie demjenigen, das man in unmodifiziertem Fibrin sah, führte.

Tabelle 3 gibt Ergebnisse der relativen Heparin-Bindungsaffinität und Steigerung des dreidimensionalen Neuriten-Auswuchses für mehrere Heparin-bindende Peptide an. Es gibt eine Korrelation zwischen der Bindungsstärke für jedes Peptid und der prozentualen Steigerung des Neuriten-Auswuchses.

Tabelle 3

Peptid-Name	Elution aus Heparin-Affinitätssäule (Mol NaCl)	Steigerung des Neuriten-Auswuchses (%)
ATIII	0,67	73,1
NCAM	0,35	24,5
PF4	0,34	20,2

BEISPIEL 3 - Kundenspezifisch gestaltete Gel-Matrix für Neuriten-Wachstum

5 Zur Erzeugung eines vernetzten Fibrin-Gels sind vier Bestandteile
notwendig. Fibrinogen, Calcium, Thrombin und Faktor XIIIa, und die
strukturellen Eigenschaften des Materials. Diese vier Bestandteile können
durch Verändern der Konzentration irgendeines unter ihnen modifiziert
werden. Es gibt zwei Hauptcharakteristika, die die Struktur des Fibrins
10 bestimmen: Die Dichte der Fibrin-Bündel und die Dicke jedes einzelnen
Bündels. Diese zwei Eigenschaften kontrollieren dann die Fähigkeit von
Zellen, die Matrix zu infiltrieren.

Es wurde gefunden, daß eine Erhöhung der Fibrin-Konzentration von 5
15 auf 15 mg/ml in dem Vorläufer-Gemisch zu Fibrin-Gelen mit kleineren
Fibrin-Bündeln, die viel dichter sind, führt. Es wurde gezeigt, daß dieses
resultierende Material für Neuriten schwieriger zu durchwandern ist.
Wenn die Calciumkonzentration von 2 auf 10 mM erhöht wurde, wurden
die Fibrin-Bündel dicker, aber der Abstand zwischen diesen Bündeln
20 wurde größer. Ein Verändern der Fibrindichte kann eindeutig eine
direkte Auswirkung auf die Zellmigration haben, während
Veränderungen in der Fibrillen-Morphologie keine haben. Die
Degradation der Fibrin-Matrix hängt ab von der Morphologie dieser
Fasern. Daher können die Fähigkeit von Zellen, das Fibrin zu
25 infiltrieren, und die Gesamtdegradation des Gels unabhängig kontrolliert
werden. Die Kinetik der Fibrinbildung ist abhängig von der Menge der
zwei Enzyme, Thrombin und Faktor XIII, die anwesend sind. Eine
Erhöhung der Konzentration an Thrombin verringert die Zeit für die
Gelierung, während eine Erhöhung der Konzentration an Faktor XIII die

Geschwindigkeit der Vernetzungs-Bildung erhöht. Durch Variieren der Konzentrationen dieser vier Vorläufer-Bestandteile werden die Fibrin-Morphologie und -Kinetik manipuliert, um eine Matrix mit optimalen Eigenschaften zu schaffen.

5

Das vorliegende Beispiel zeigt Verfahren zur Kontrolle der zellvermittelten Geschwindigkeit der Fibrin-Degradation. Ein Verfahren zur Kontrolle der Degradation des Materials ist, die strukturellen Eigenschaften durch die Anfangskonzentration der Vorläufer-Komponenten zu modifizieren. Durch Herstellung eines Fibrin-Gels, das dichter ist, werden die Geschwindigkeit der Zellinfiltration und die dazu in Beziehung stehende Zell-Degradation verringert. Dies kann erreicht werden durch Erhöhen der Dichte des Gels entweder durch eine Erhöhung der Fibrinogen-Konzentration oder eine Erhöhung der Vernetzung durch die Menge an Faktor XIIIa.

10

15

Ein weiteres Beispiel beinhaltet das Kontrollieren der Degradationsrate durch Vernetzen exogener Protease-Inhibitoren in das Fibrin-Gel. Um die Wirksamkeit dieser Inhibitoren zu maximieren, müssen sie kovalent an das Gel gebunden werden, um eine hohe lokale Konzentration zu schaffen. Daher werden die Proteasen entweder so ausgewählt oder so manipuliert, daß sie eine Faktor XIIIa-Substratstelle haben. In dem Beispiel des 2-Plasmin-Inhibitors ist bereits eine Substrat-Sequenz vorhanden. Für andere Proteine, wie Aprotinin, wird diese Stelle in einigen Ausführungsformen der Erfindung in das Protein eingebaut. Diese Proteine werden dann dem Koagulationsgemisch zugesetzt, und man läßt sie in das Fibrin vernetzen. Durch diese kovalente Vernetzung bleiben die Inhibitoren in dem Gel bis die enzymatische Degradation des Fibrins beginnt. Diese Anfangsdegradation setzt dann die gebundenen

20

25

- Inhibitoren frei, was eine weit verbreitete Degradation der Fibrin-Matrix verhindert. Dieses Verfahren kann auch dadurch weiter modifiziert werden, daß eine enzymatische Degradations-Stelle zwischen der vernetzenden Domäne und der aktiven Protein-Domäne in den Protease-Inhibitor inkorporiert wird. Dieses Verfahren erlaubt dann, daß der Protease-Inhibitor frei von Fibrin-Degradationsprodukten freigesetzt wird, was möglicherweise die Wirksamkeit des freigesetzten Inhibitors erhöht.
- 5
- 10 Ein weiteres Beispiel beinhaltet das Vernetzen von Zwei-Domänen-Peptiden, die eine Faktor XIIIa-Substratsequenz und eine Protease-bindende Domäne enthalten, in das Fibrin. Die bindende Domäne in dem Peptid könnte eine Degradations-Stelle sein, die so ausgewählt wurde, daß sie ein niedriges k_m und ein niedriges k_{cat} hat, was zu einem hohen
- 15 Grad an Enzym-Bindung an der Stelle, aber einem geringen Grad an enzymatischer Aktivität führt. Dies würde dann dazu dienen, den inkorporierten Peptiden zu erlauben, als ein um Fibrin-Degradationsstellen konkurrierender Inhibitor zu wirken. Da jedoch das inkorporierte Peptid mit einer sehr langsamen Rate gespalten würde,
- 20 würde es die Protease wirksam immobilisieren und daran hindern, die Fibrin-Matrix abzubauen. Außerdem könnte die bindende Domäne mit der Protease über eine nicht mit der enzymatischen Aktivität in Beziehung stehende Stelle wechselwirken (d. h. Heparin-Bindung). Dies würde dann der Protease erlauben, in dem Fibrin abgesondert zu werden,
- 25 bevor sie auch das Gel abbauen könnte.

Alle hierin offenbarten und beanspruchten Zusammensetzungen und Verfahren können im Lichte der vorliegenden Offenbarung ohne unangemessenes Experimentieren hergestellt und durchgeführt werden.

Die Zusammensetzungen und Verfahren dieser Erfindung wurden zwar in Form von bevorzugten Ausführungsformen beschrieben, aber für Fachleute wird es offensichtlich sein, daß an der Zusammensetzung, den Verfahren und den Schritten oder in der Folge von Schritten des hierin beschriebenen Verfahrens Variationen durchgeführt werden können, ohne von dem Konzept, Geist und Umfang der Erfindung abzuweichen. Insbesondere wird es offensichtlich sein, daß die hierin beschriebenen Mittel gegen bestimmte Mittel, die sowohl chemisch als auch physiologisch verwandt sind, ausgetauscht werden können, wobei gleiche oder ähnliche Ergebnisse erzielt würden. Alle derartigen ähnlichen Ersatzstoffe und Abwandlungen, die für Fachleute offensichtlich sind, werden als innerhalb des Geistes, Umfangs und Konzepts der Erfindung, wie sie durch die angefügten Ansprüche definiert wird, betrachtet.

15

Literaturzitate

5 Die folgenden Literaturstellen werden hiermit durch Bezugnahme in dem Umfang, in dem sie beispielhafte Verfahrens- oder andere Details liefern, welche die hierin dargelegten ergänzen, ausdrücklich aufgenommen.

- 10
1. Massia, S.P. et al, (1991). *Journal of Cell Biology* 114:1089-1100.
 2. Yamada, K.M. (1991). *Journal of Biological Chemistry* 266:12809-12812.
 3. DiMilla, P.A., et al, (1991). *Biophysics Journal* 60:15-37.
 4. Tashiro K., et al, (1989). *Journal of Biological Chemistry* 264:16174-16182.
 5. Martin, G.R. (1987). *Annual Review of Cellular Biology* 3:57-85.
 6. Kleinman, H.K., et al, (1993). *Vitamins and Hormones* 47:10-93.
 7. Edgar D, et al, (1984). *EMBO* 3:1463-1468.
 8. Borrajo A, et al, (1997). *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 7:1185-1190.
 9. Kallapur, S., et al, (1992). *Journal of Neuroscience Research* 33:538-548.
 10. Kaneda N., et al, (1996). *Journal of Biochemistry* 119:1150-1156.
 11. Rogers S., et al, (1985). *Journal of Neuroscience* 5:369-378.
 12. Herbert, C.B., et al, (1996). *Journal of Comparative Neurology* 365:380-391.
 13. Herbert, C.B., (1998). *J Biomed Mater Res* 40:551-559.

SEQUENZ-PROTOKOLL

SEQ ID NO: SEQUENZ

5

1	IKVAV
2	RGD
3	YIGSR
4	DGEA
5	RNLAETIKDI
6	HAV
7	NCAM
8	K(β A)FAKLAARLYRKA
9	YKKIHKL
10	KHKGRDVILKKDVR
11	YEKPGSPPREVVPRPRPCV
12	KNNQKSEPLIGRKKT
13	KDPKRL
14	YRSRKY
15	YKKPKL
16	AKRSSKM
17	CRKRCN
18	LNQEQVSP K(β A)FAKLAARLYRKA
19	LNQEQVSP YKKIHKL
20	LNQEQVSP KHKGRDVILKKDVR

K 51 374/8

ANSPRÜCHE

5

1. Fibrin-Gel, aufweisend ein die Neuriten-Extension förderndes Verhältnis eines Gemisches von Peptiden, wobei die Peptide mit dem Fibrin-Gel vernetzt sind.

10

2. Protein-Gel, andere Proteine als Fibrin aufweisend, wobei an das Protein-Gel ein Gemisch von Peptiden in einem die Neuriten-Extension fördernden Verhältnis vernetzt gebunden ist.

15

3. Zwei-Domänen-Peptid, aufweisend eine erste Domäne aus einer Heparin-bindenden Domäne und eine zweite Domäne, die im wesentlichen aus einem Faktor XIIIa-Substrat oder einem bioaktiven Peptid besteht.

20

4. Zwei-Domänen-Peptid nach Anspruch 3, bei dem die erste Domäne außerdem gekennzeichnet ist durch ein Peptid $K\beta AFAKLAARLYRKA$ oder $YKKIIKKL$ oder $KHKGRDVILKKDVR$ oder ein Gemisch davon.

25

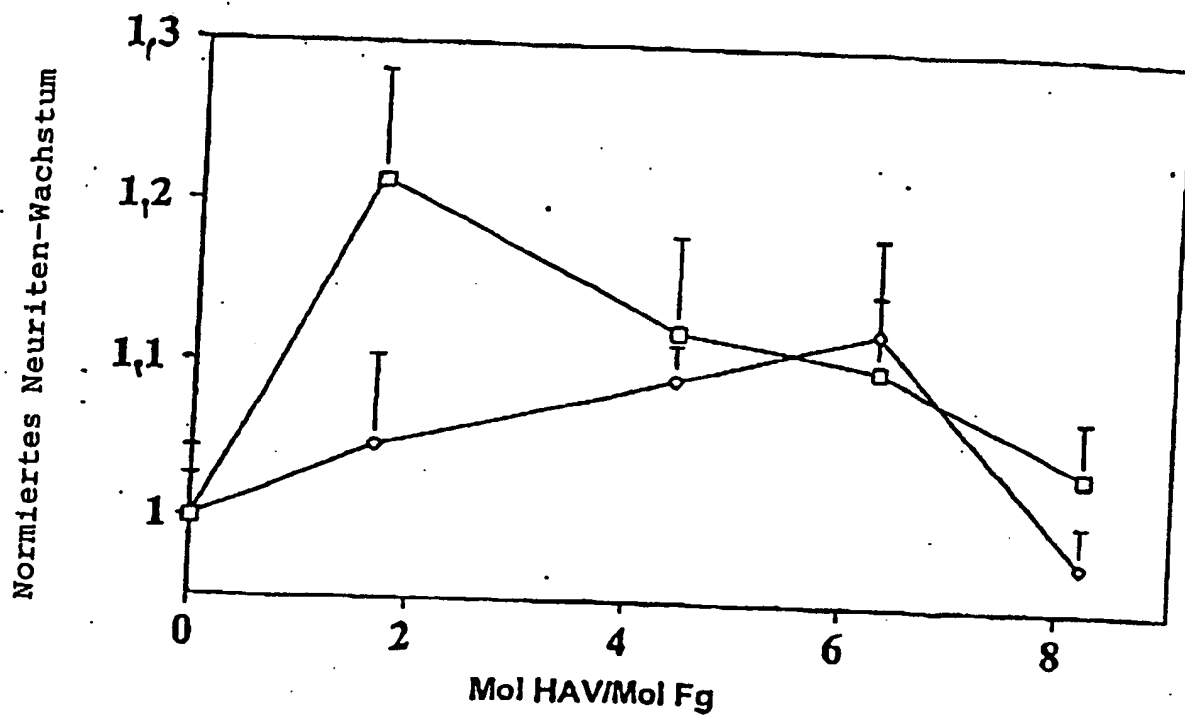
5. Protein-Gel, an das das Zwei-Domänen-Peptid nach Anspruch 3 oder 4 chemisch vernetzt gebunden ist.
6. Fibrin, aufweisend das Zwei-Domänen-Peptid nach einem der Ansprüche 3 bis 5.

7. Fibrin, aufweisend eine Heparin-bindende Domäne von ATIII.
8. Zellmatrix, aufweisend Fibrin nach Anspruch 6.
- 5 9. Zellmatrix, aufweisend Fibrin nach Anspruch 7.
- 10 10. Fibrin, aufweisend ein Peptid mit Heparin-bindender Domäne, das aus einer Heparin-Affinitätssäule bei $[\text{NaCl}] > 0,34 \text{ Mol}$ eluiert.
- 10 11. Fibrin nach Anspruch 6 oder 7, wobei das Peptid in ein Protein-Gel vernetzt ist.
12. Protein-Gel, aufweisend einen chemisch gebundenen Protease-Inhibitor.
- 15 13. Protein-Gel nach Anspruch 12, bei dem der Protease-Inhibitor $\alpha_2\text{-PI}$ ist.
- 20 14. Protein-Gel nach Anspruch 12, bei dem der Protease-Inhibitor modifiziertes Aprotinin, einer Faktor XIIIa-Substrat-Stelle ist.
- 25 15. Protein-Gel nach Anspruch 12, bei dem der Protease-Inhibitor ein modifiziertes Aprotinin, eine Faktor XIIIa-Substrat- und eine Protease-Degradations-Stelle aufweist.
16. Protein-Gel nach Anspruch 12, bei dem der Protease-Inhibitor ein modifiziertes Aprotinin und eine Heparin-Bindungsdomänen-Sequenz aufweist.

17. Protein-Gel nach Anspruch 12, bei dem der Protease-Inhibitor ein modifiziertes Aprotinin mit einer hbd und einer Protease-Degradations-Stelle aufweist.
- 5 18. Protein-Gel, aufweisend ein Peptid mit einer kovalent in das Gel inkorporierten Protease-Bindungsstelle.
- 10 19. Protein-Gel nach Anspruch 18, bei dem die Protease-Bindungsstelle eine Stelle für enzymatische Spaltung ist, wobei die Stelle für enzymatische Spaltung außerdem dadurch gekennzeichnet ist, daß sie einen niedrige k_{cat} und eine hohe k_m hat.
- 15 20. Protein-Gel nach Anspruch 18, bei dem die Protease-Bindungsstelle außerdem als eine enzymatisch bindende Domäne gekennzeichnet ist.
- 20 21. Dreidimensionale Matrix, die zur Unterstützung der Nervenzellen-Extension in der Lage ist, aufweisend eine die Neuritenzellen-Extension fördernde Menge eines Gemisches von Peptiden, wobei jedes der Peptide eine Sequenz aufweist, die eine Heparin-bindende Sequenz definiert.
- 25 22. Dreidimensionale Matrix nach Anspruch 21, die außerdem als ein Fibrin-Gel gekennzeichnet ist.
23. Dreidimensionale Matrix nach Anspruch 21 oder 22, bei der das Gemisch von Peptiden ein Heparin-bindendes Peptid von Antithrombin II aufweist.

24. Dreidimensionale Matrix nach einem der Ansprüche 21 bis 23, bei der das Heparin-bindende Peptid an das Fibrin-Gel vernetzt gebunden ist.
- 5 25. Dreidimensionale Matrix nach einem der Ansprüche 21 bis 24, bei der das Heparin-bindende Peptid außerdem als die Heparin-bindende Peptidsequenz von Antithrombin III gekennzeichnet ist.
26. Chimäres Peptid, aufweisend:
- 10 (a) eine erste C-terminale Domäne, aufweisend eine Heparin-bindende Peptidsequenz von Antithrombin III, und
(b) eine zweite N-terminale Domäne, aufweisend ein α -Plasmininhibitor-Substrat für Faktor XIIIa.
- 15 27. Fibrin-Gel, an das das chimäre Peptid nach Anspruch 26 chemisch vernetzt ist.
28. Fibrin-Gel nach Anspruch 27, bei dem das chimäre Peptid etwa 8 Mol Peptid pro Mol Fibrin aufweist.
- 20

Figur 1



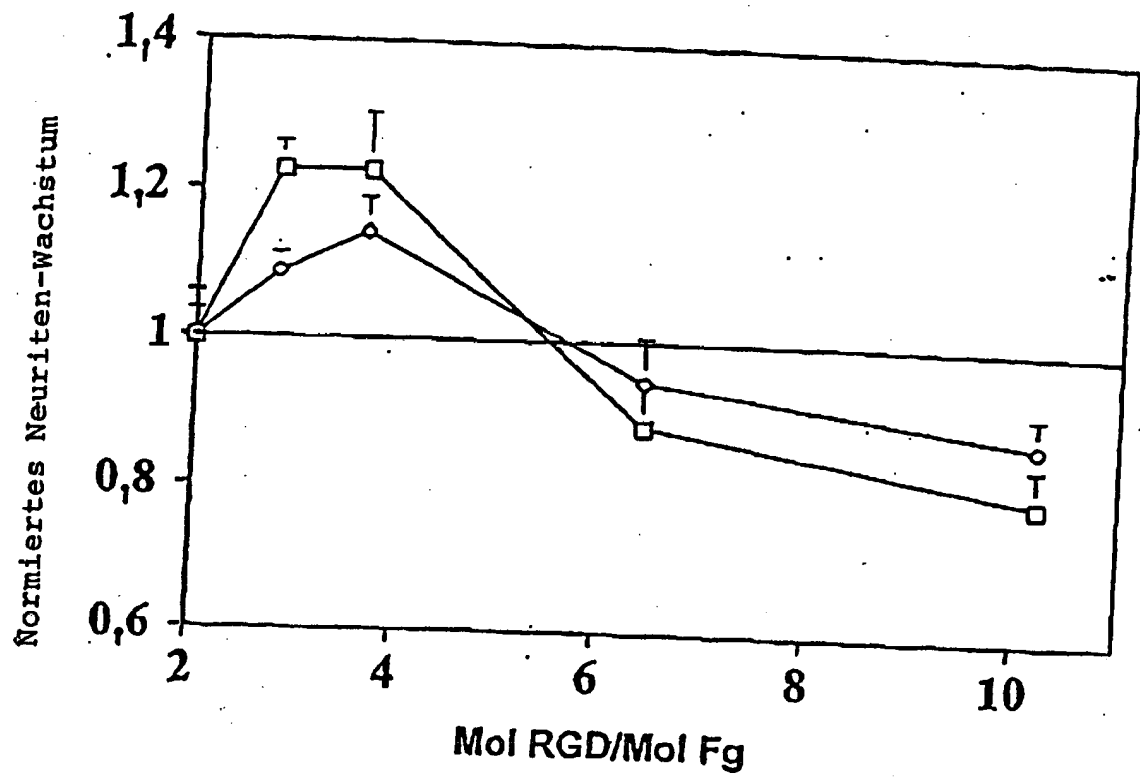
Legende:

□ 24 Stunden

◇ 48 Stunden

08.06.00

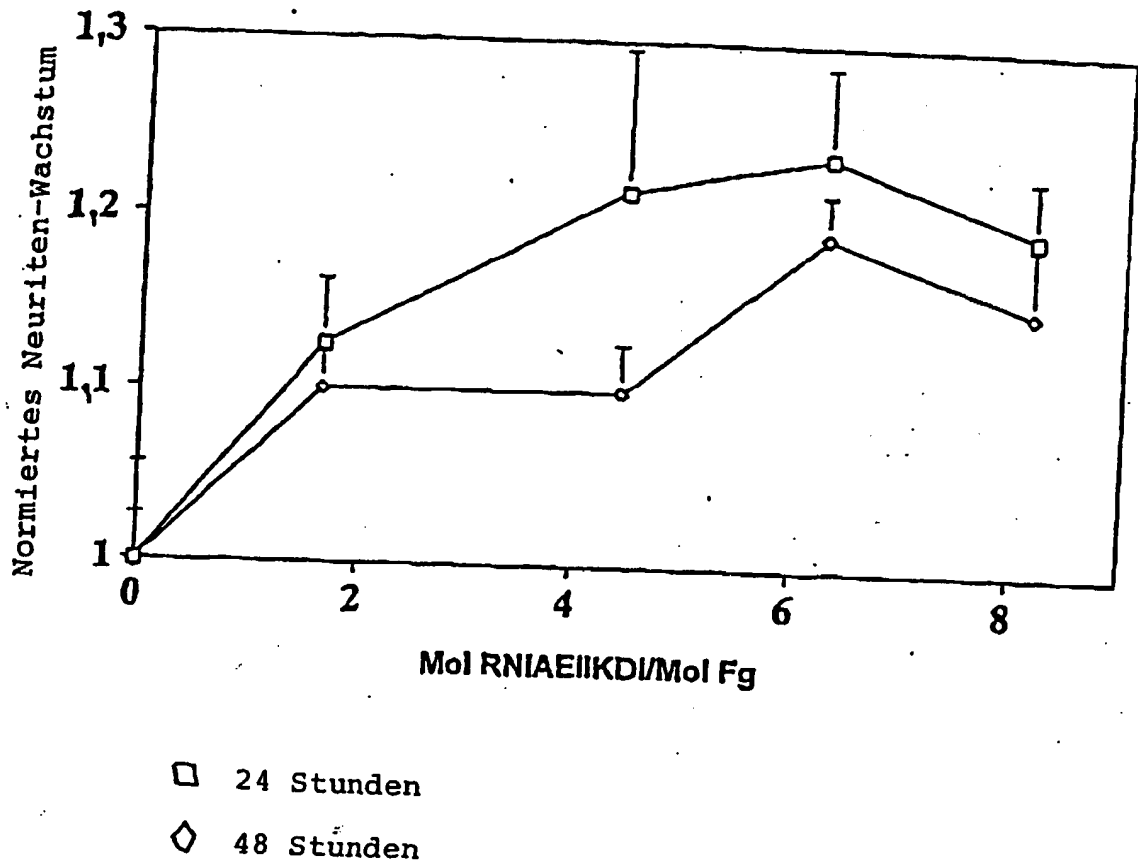
Figur 2



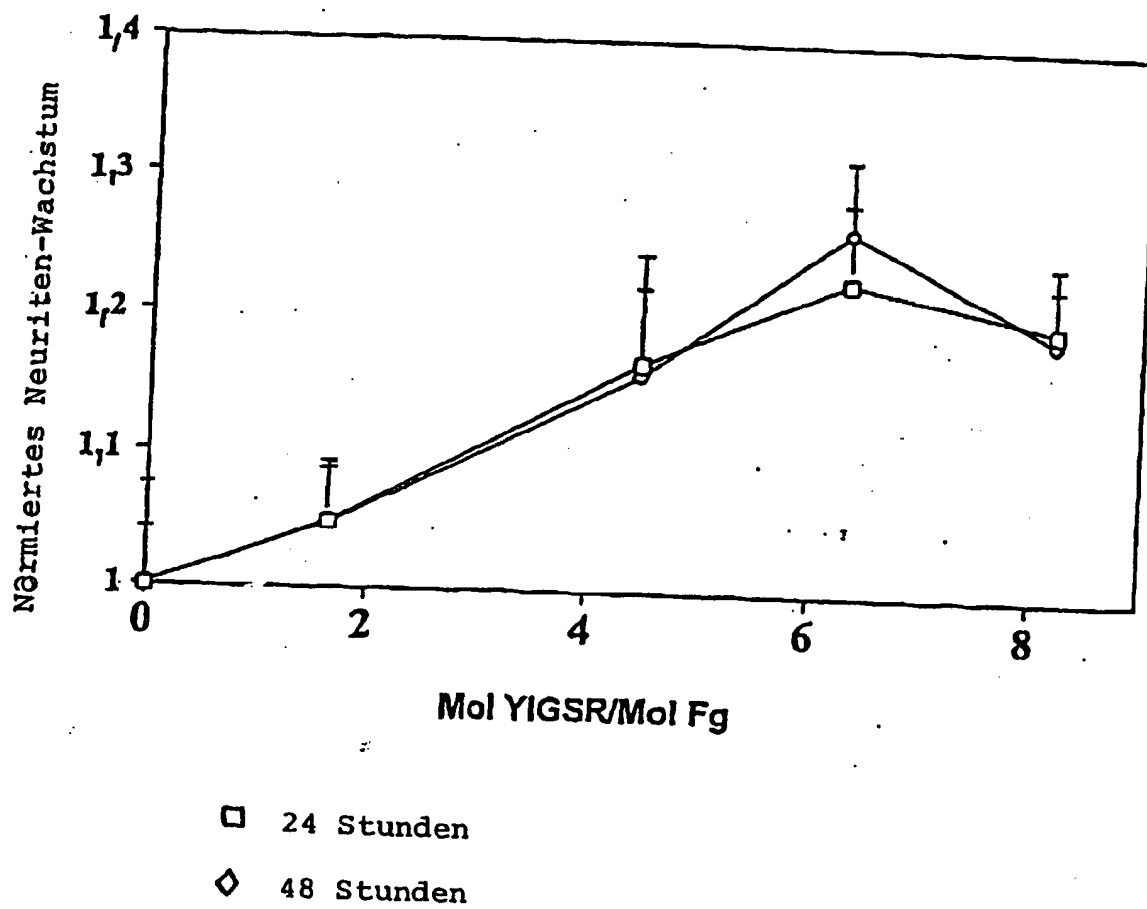
□ Daten bei 24 Stunden

◇ Daten bei 48 Stunden

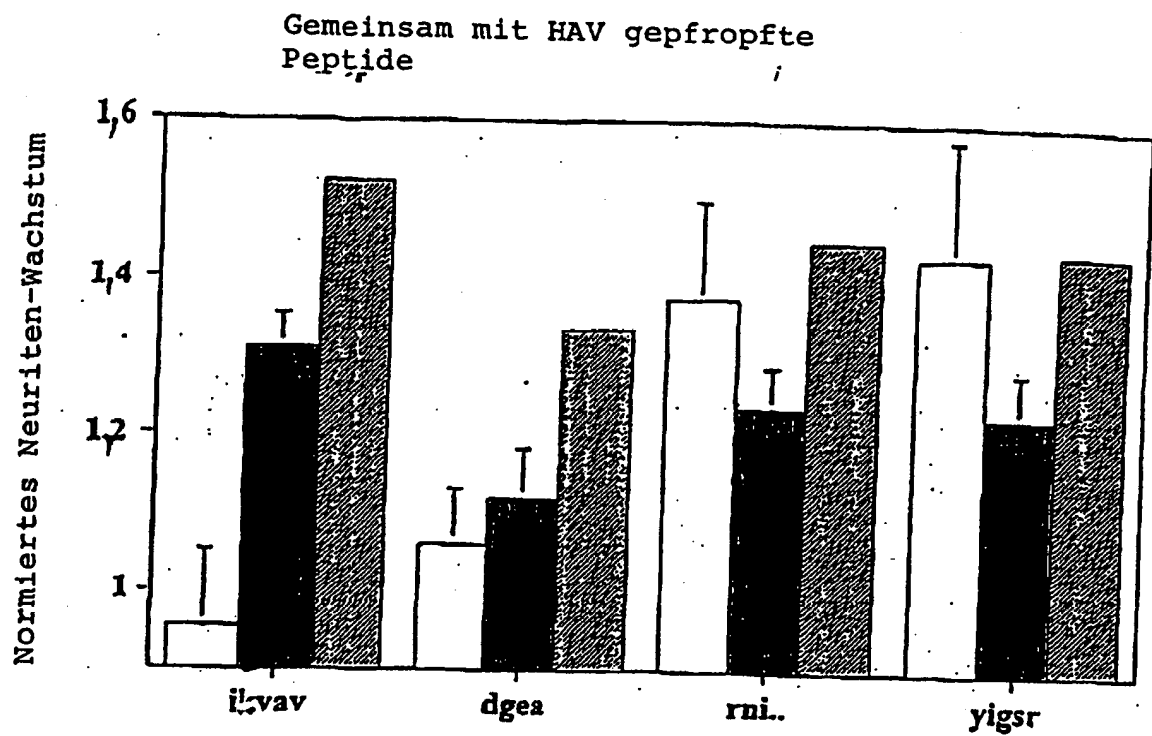
Figur 4



Figur 5



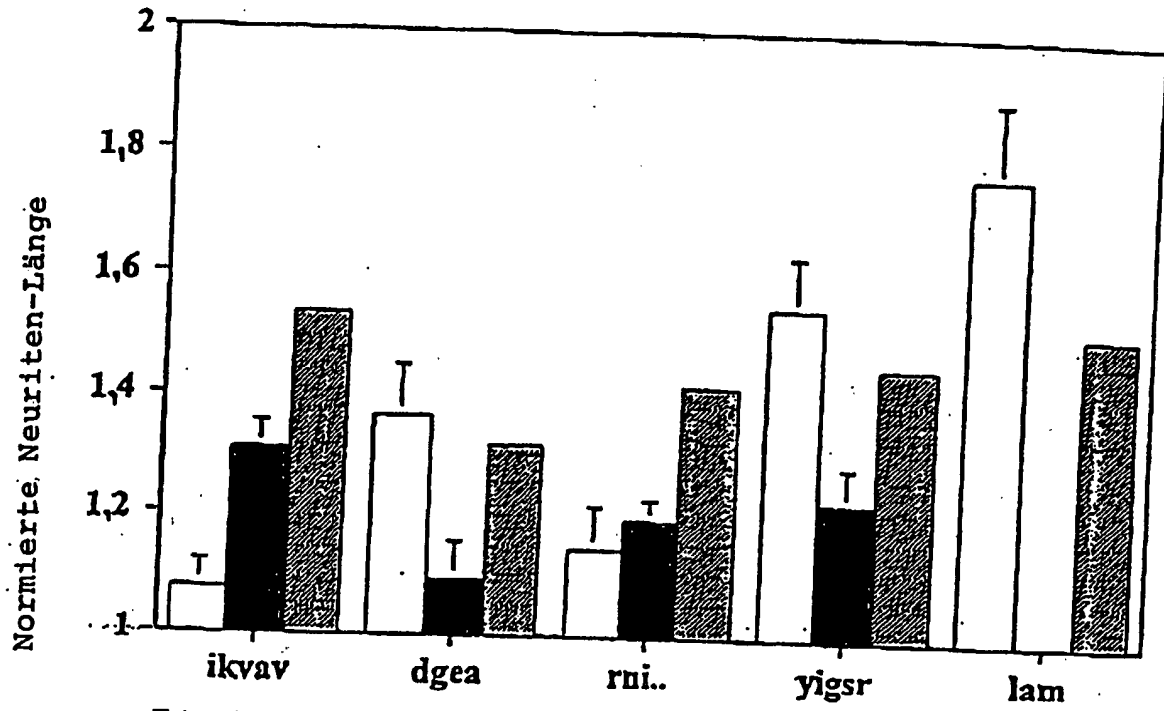
Figur 6



- Wachstum in Kombination
- Wachstum alleine
- ▨ additive Ergebnisse vom Wachstum alleine

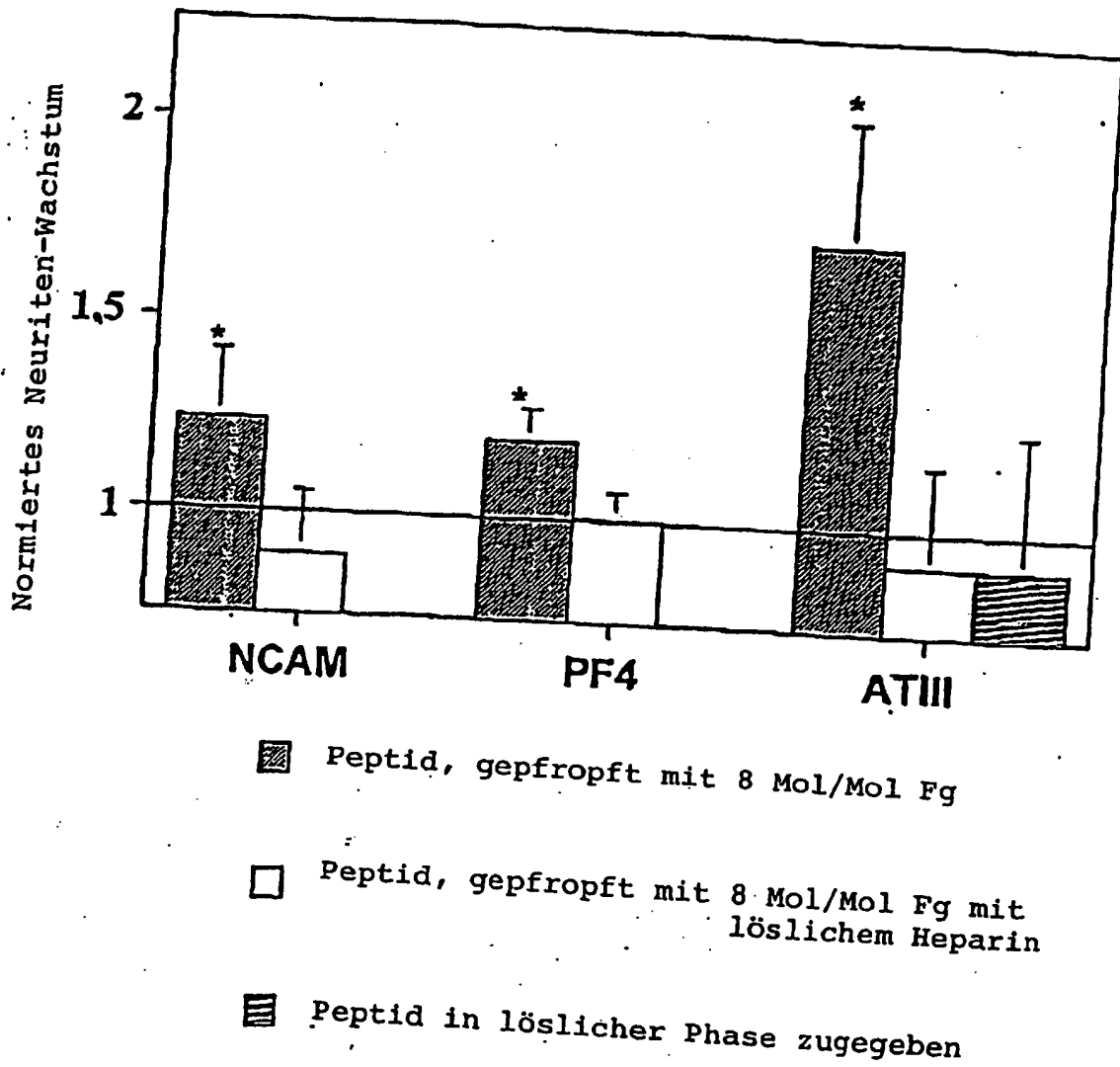
Figur 7

Gemeinsames Pfropfen von RGD
mit anderen Peptiden.



- ☐ mit RGD gepfropft
- ☒ Probe alleine gepfropft
- ☒ kumulativer Wert für Probe und RGD

Figur. 8



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.